



**Biji kakao**



© BSN 2008

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Mangala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup .....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi .....	1
4 Penggolongan.....	3
5 Syarat mutu.....	3
6 Pengambilan contoh .....	3
7 Cara uji.....	4
8 Syarat lulus uji.....	8
9 Syarat penandaan.....	8
10 Rekomendasi atau pengujian tambahan .....	8
Lampiran A (normatif) Penentuan kadar kulit dan kadar keping.....	9
Lampiran B (normatif) Penentuan kadar lemak total .....	10
Lampiran C (normatif) Penentuan kadar asam lemak bebas (sebagai asam oleat).....	12
Lampiran D (normatif) Penentuan pH keping biji.....	13
Lampiran E (normatif) Penentuan cemaran logam cadmium (Cd) .....	14
Lampiran F (normatif) Penetapan kadar besi (Fe), tembaga (Cu) dan seng (Zn) .....	16
Lampiran G (normatif) Penetapan kadar timbal (Pb).....	17
Lampiran H (normatif) Penetapan kadar raksa (Hg).....	19
Lampiran I (normatif) Penetapan kadar arsen (As) .....	20
Lampiran J (normatif) Penentuan kapang dan khamir.....	22
Lampiran K (normatif) Penentuan jumlah bakteri total (angka lempeng total).....	24
Lampiran L (normatif) Penentuan bakteri coliform.....	26
Lampiran M (normatif) Penentuan salmonella .....	28
Lampiran N (normatif) Penentuan filth.....	34
Lampiran O (normatif) Penentuan residu pestisida .....	36
Bibliografi .....	37
Tabel 1 - Persyaratan mutu .....	3
Tabel 2 - Persyaratan mutu .....	3
Tabel L.3 - APM /MPN per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat ....	27
pengenceran (0,1 g/ml ; 0,01 g/ml dan 0,001 g/ml contoh.....	27
Tabel M.4 - Reaksi biokimia <i>salmonella</i> .....	33
Tabel M.5 - Kriteria untuk biakan non <i>salmonella</i> .....	33



## Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-2323-2002 *Biji kakao* direvisi berdasarkan usulan dari stakeholder Kakao Indonesia, dengan memperhatikan standar yang digunakan oleh negara-negara produsen lain dan syarat mutu yang diminta oleh konsumen serta perkembangan situasi perkakaoan dunia.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 65-03 Pertanian, yang telah dibahas dalam rapat-rapat teknis dan terakhir dirumuskan dalam rapat konsensus pada tanggal 8 Oktober 2006 di Jakarta yang dihadiri oleh wakil-wakil produsen, konsumen, asosiasi, balai-balai penelitian serta instansi pemerintah yang terkait.

Standar ini telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal 21 Juni 2007 sampai dengan 21 Agustus 2007 dan pemungutan suara pada tanggal 7 April 2008 sampai dengan 7 Juni 2008.





## Biji kakao

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan penggolongan, syarat mutu, cara pengambilan contoh, cara uji, syarat lulus uji, syarat penandaan, pengemasan dan rekomendasi biji kakao.

### 2 Acuan normatif

SNI 19-0428-1998, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

### 3 Istilah dan definisi

#### 3.1

##### **biji kakao**

biji tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) yang berasal dari biji kakao mulia atau biji kakao lindak yang telah melalui proses pemeraman, dicuci atau tanpa dicuci, dikeringkan dan dibersihkan

#### 3.2

##### **biji kakao mulia**

biji kakao yang berasal dari tanaman kakao jenis *Criolo* dan *Trinitario* serta hasil persilangannya

#### 3.3

##### **biji kakao lindak**

biji kakao yang berasal dari tanaman kakao jenis *Forastero*

#### 3.4

##### **biji pecah**

biji kakao dengan bagian yang hilang berukuran setengah ( $\frac{1}{2}$ ) atau kurang dari bagian biji kakao yang utuh

#### 3.5

##### **biji cacat**

biji kakao yang berjamur, *slaty*, biji berserangga, biji pipih, biji berkecambah

#### 3.6

##### **biji berjamur**

biji kakao yang ditumbuhi jamur di bagian dalamnya dan apabila dibelah dapat terlihat dengan mata

#### 3.7

##### **biji berserangga**

biji kakao yang dibagian dalamnya terdapat serangga pada stadia apapun atau terdapat bagian-bagian dari tubuh serangga, atau yang memperlihatkan kerusakan karena serangga yang dapat dilihat oleh mata

#### 3.8

##### **biji pipih**

biji kakao yang tidak mengandung keping biji atau keping bijinya tidak dapat dibelah



**3.9**

**biji berkecambah**

biji kakao yang kulitnya telah pecah atau berlubang karena pertumbuhan lembaga

**3.10**

**biji tidak terfermentasi (biji *slaty*)**

Pada kakao lindak memperlihatkan separuh atau lebih permukaan irisan keping biji berwarna keabu-abuan seperti sabak atau biru keabu-abuan bertekstur padat dan pejal dan pada kakao mulia permukaannya berwarna putih kotor

**3.11**

**biji fermentasi**

biji yang memperlihatkan  $\frac{3}{4}$  atau lebih permukaan irisan keping biji berwarna coklat, berongga dan beraroma khas kakao

**3.12**

**pecahan biji**

biji kakao yang berukuran kurang dari setengah ( $\frac{1}{2}$ ) bagian biji kakao yang utuh

**3.13**

**pecahan kulit**

bagian kulit biji kakao tanpa keping biji

**3.14**

**benda-benda asing**

benda-benda lain yang bukan berasal dari tanaman kakao

**3.15**

**kotoran (*waste*)**

benda-benda berupa plasenta, biji dempet (*cluster*), pecahan biji, pecahan kulit, biji pipih, ranting dan benda lainnya yang berasal dari tanaman kakao

**3.16**

**keping biji**

biji kakao tanpa kulit

**3.17**

**biji berbau asap abnormal, atau berbau asing**

biji yang berbau asap, berbau *hammy* atau bau asing lainnya yang ditentukan metode uji

**3.18**

**serangga hidup**

serangga pada stadia apapun yang ditemukan hidup pada partai barang

**3.19**

**biji dempet (*cluster*)**

biji kakao yang melekat (dempet) tiga atau lebih yang tidak dapat dipisahkan dengan satu tangan

**3.20**

**plasenta**

bagian dari buah kakao tempat melekatnya biji



## 4 Penggolongan

4.1 Menurut jenis tanaman, biji kakao digolongkan dalam:

- 1) jenis mulia (*fine cocoa/F*);
- 2) jenis lindak (*bulk cocoa/B*).

4.2 Menurut jenis mutunya, biji kakao digolongkan dalam 3 jenis mutu:

- 1) mutu I;
- 2) mutu II;
- 3) mutu III.

4.3 Menurut ukuran berat bijinya, yang dinyatakan dengan jumlah biji per 100 g contoh, biji kakao digolongkan dalam 5 golongan ukuran dengan penandaan:

- AA : maksimum 85 biji per seratus gram;  
 A : 86 -100 biji per seratus gram;  
 B : 101 - 110 biji per seratus gram;  
 C : 111 - 120 biji per seratus gram;  
 S : lebih besar dari 120 biji per seratus gram.

## 5 Syarat mutu

### 5.1 Syarat umum

Tabel 1 - Persyaratan mutu

No	Jenis uji	Satuan	Persyaratan
1	Serangga hidup	-	tidak ada
2	Kadar air	% fraksi massa	maks. 7,5
3	Biji berbau asap dan atau <i>hammy</i> dan atau berbau asing	-	tidak ada
4	Kadar benda asing	-	tidak ada

### 5.2 Syarat khusus

Tabel 2 - Persyaratan mutu

Satuan dalam persen

Jenis mutu		Persyaratan				
Kakao Mulia ( <i>Fine Cocoa</i> )	Kakao Lindak ( <i>Bulk Cocoa</i> )	Kadar biji berjamur (biji/biji)	Kadar biji <i>slaty</i> (biji/biji)	Kadar biji berserangga (biji/biji)	Kadar kotoran waste (biji/biji)	Kadar biji berkecam bah (biji/biji)
I – F	I – B	Maks. 2	Maks. 3	Maks. 1	Maks. 1,5	Maks. 2
II – F	II – B	Maks. 4	Maks. 8	Maks. 2	Maks. 2,0	Maks. 3
III – F	III – B	Maks. 4	Maks. 20	Maks. 2	Maks 3,0	Maks. 3

## 6 Pengambilan contoh

Pengambilan contoh dilakukan terhadap partai barang yang siap diperdagangkan. Setiap partai barang maksimum 50 ton diambil contohnya secara acak sebanyak 30 % dari jumlah karung. Masing-masing karung diambil contohnya  $\pm$  150 g dari bagian atas, tengah dan bawah karung, sesuai SNI 19-0428-1998, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*. Contoh-



contoh tersebut dicampur sehingga merata dan kemudian dibagi empat dan dua bagian diambil secara diagonal. Cara ini dilakukan beberapa kali sampai mencapai contoh seberat 3 x 1 kg. Contoh kemudian dimasukkan ke dalam kantung plastik putih transparan baru berukuran 30 cm x 20 cm x 0,03 cm, dan bersih, kemudian disegel dan diberi label di tempat pengambilan contoh. Setelah itu, semua karung yang diambil contoh diberi segel.

Petugas pengambil contoh harus memenuhi syarat, yaitu berpengalaman, terlatih dan diregistrasi oleh instansi yang berwenang dan mempunyai ikatan dengan suatu badan hukum.

## **7 Cara uji**

### **7.1 Penentuan adanya serangga hidup dan benda asing**

#### **7.1.1 Prinsip**

Pengamatan secara visual adanya serangga hidup dan benda asing pada saat kemasan contoh uji dibuka.

#### **7.1.2 Prosedur**

Amati dengan seksama adanya serangga hidup dan benda asing pada sekeliling partai dan pada saat kemasan contoh dibuka.

#### **7.1.3 Cara menyatakan hasil**

Apabila tidak ditemukan adanya serangga hidup, maka contoh uji dinyatakan tidak ada. Apabila ditemukan adanya serangga hidup, maka contoh uji dinyatakan ada. Apabila tidak ditemukan adanya benda asing, maka contoh uji dinyatakan tidak ada. Apabila ditemukan adanya benda asing, maka contoh uji dinyatakan ada.

### **7.2 Penentuan kadar air**

#### **7.2.1 Prinsip**

Pengurangan bobot selama 16 jam pengeringan dalam oven yang terkontrol pada suhu  $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$ .

#### **7.2.2 Peralatan**

- mortar dan lumpang atau blender yang dapat digunakan untuk memecahkan biji kakao tanpa menimbulkan panas;
- oven yang mempunyai ventilasi, yang dapat mempertahankan suhu pada  $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ;
- cawan dan penutup terbuat dari logam yang tidak menjadi karat apabila digunakan dalam suasana tertentu selama analisis atau terbuat dari kaca dengan permukaan efektif sekurang-kurangnya  $35 \text{ cm}^2$  dan kedalaman 20 cm sampai dengan 30 cm;
- eksikator yang berisi zat pengering yang efisien;
- neraca analisis kapasitas 200 g, ketelitian 0,1 mg.

#### **7.2.3 Prosedur**

##### **7.2.3.1 Persiapan contoh**

- ambillah contoh laboratorium yang telah tercampur dengan baik sebanyak  $\pm 12 \text{ g}$ ;



- b) pecahkan dengan mortar atau blender selama kurang dari 1 (satu) menit, sehingga ukuran partikel yang terbesar tidak melebihi 5 mm. Hindarkan terbentuknya bubur coklat (pasta).

#### 7.2.3.2 Penetapan

- timbang dengan segera contoh uji yang telah dipecahkan sebanyak 10 g ke dalam cawan bertutup yang terlebih dahulu telah ditetapkan bobotnya;
- tempatkan cawan beserta isinya di dalam oven pada suhu  $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$  (cawan dalam keadaan terbuka) selama 16 jam, dengan tidak sekali-kali membuka oven, sesudah 16 jam, cawan ditutup menggunakan penutupnya dan keluarkan dengan segera untuk dimasukkan ke dalam eksikator;
- timbang cawan bertutup beserta isinya;
- lakukan penetapan duplo.

#### 7.2.4 Cara menyatakan hasil

Kadar air dinyatakan dalam persentase bobot / bobot sama dengan:

$$\frac{(M_1 - M_2)}{(M_1 - M_0)} \times 100 \%$$

dengan pengertian:

$M_0$  adalah bobot cawan dan tutupnya, dinyatakan dalam gram;

$M_1$  adalah bobot cawan, tutup dan contoh uji sebelum pengeringan, dinyatakan dalam gram;

$M_2$  adalah bobot cawan, tutup dan contoh uji sesudah pengeringan, dinyatakan dalam gram.

**CATATAN** Pemecahan dan penimbangan contoh uji untuk setiap penentuan harus dilaksanakan secepat mungkin. Perbedaan antara 2 hasil penentuan dengan analisis yang sama, tidak melebihi dari 0,03 g pengurangan berat per 10 g contoh.

### 7.3 Penentuan adanya biji berbau asap abnormal dan berbau asing lainnya

#### 7.3.1 Prinsip

Pengamatan secara organoleptik adanya bau asap abnormal dan bau asing lainnya pada bagian dalam biji kakao yang telah dibelah.

#### 7.3.2 Prosedur

Amati secara organoleptik adanya bau asap abnormal dan bau asing lainnya dengan mencium bagian dalam dari setiap contoh uji yang telah dibelah terlebih dahulu.

#### 7.3.3 Cara menyatakan hasil

Apabila tidak ditemukan adanya bau asap abnormal, dan bau asing lainnya maka contoh uji dinyatakan tidak ada. Apabila ditemukan adanya bau asap abnormal, dan bau asing lainnya maka contoh uji dinyatakan ada.

### 7.4 Penentuan kadar kotoran (waste)

#### 7.4.1 Prinsip

Pemisahan secara visual dan penimbangan.



#### 7.4.2 Peralatan

- a) neraca analitis dengan ketelitian 0,01 gram;
- b) kaca arloji/cawan plastik/cawan aluminium;
- c) ayakan dengan ukuran diameter lubang 7,5 mm;
- d) kertas putih.

#### 7.4.3 Prosedur

- a) timbang contoh uji sebanyak  $\pm 1000$  g;
- b) pisahkan kotoran berupa plasenta, biji Dempet (*cluster*), pecahan biji, pecahan kulit, biji pipih dan ranting, ke dalam kaca arloji/cawan; ke dalam kaca arloji/cawan lainnya yang telah diketahui bobotnya;
- c) timbang masing-masing kaca arloji/cawan yang berisi kotoran dan benda asing.

#### 7.4.4 Cara menyatakan hasil

Kadar kotoran (*waste*) dan kadar benda asing, masing-masing dinyatakan dalam persentase bobot per bobot dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\frac{(M_2 - M_1)}{M_0} \times 100 \%$$

dengan pengertian:

$M_0$  adalah bobot contoh uji, dinyatakan dalam gram;

$M_1$  adalah bobot kaca arloji/cawan kosong, dinyatakan dalam gram;

$M_2$  adalah bobot kaca arloji/cawan dan kotoran, dinyatakan dalam gram.

### 7.5 Penentuan kadar biji pecah

#### 7.5.1 Prinsip

Pemisahan secara visual dan penimbangan.

#### 7.5.2 Peralatan

- a) kaca arloji/cawan plastik/cawan aluminium;
- b) neraca analisis, ketelitian 0,01 gram.

#### 7.5.3 Prosedur

- a) Timbang contoh uji sebanyak  $\pm 100$  g;
- b) Pisahkan biji pecah, ke dalam kaca arloji/cawan yang telah diketahui bobotnya;
- c) Timbang masing-masing kaca arloji/cawan yang berisi biji pecah.

#### 7.5.4 Cara menyatakan hasil

Kadar biji pecah dinyatakan dalam persentase bobot per bobot dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\frac{(M_2 - M_1)}{M_0} \times 100 \%$$



dengan pengertian:

$M_0$  adalah bobot contoh uji, dinyatakan dalam gram;

$M_1$  adalah bobot kaca arloji/cawan kosong, dinyatakan dalam gram;

$M_2$  adalah bobot kaca arloji/cawan dan biji pecah, dinyatakan dalam gram.

## 7.6 Penentuan jumlah biji kakao per seratus gram

### 7.6.1 Prinsip

Penimbangan dan penghitungan.

### 7.6.2 Peralatan

Neraca analitis, ketelitian 0,01 gram.

### 7.6.3 Prosedur

- timbang contoh uji sebanyak  $\pm 100$  g;
- hitung jumlah biji yang terdapat dalam 100 g tersebut (x).

### 7.6.4 Cara menyatakan hasil

Hasil uji dinyatakan sesuai dengan jumlah biji yang dihitung dalam 100 g contoh uji sebagai berikut:

- Jumlah biji (x) sampai dengan 85 biji, dinyatakan AA.
- Jumlah biji (x) -100 biji, dinyatakan A.
- Jumlah biji (x) -110 biji, dinyatakan B.
- Jumlah biji (x) -120 biji, dinyatakan C.
- Jumlah biji (x) melebihi dari 120 biji, dinyatakan S.

## 7.7 Penentuan kadar biji cacat pada kakao (biji berjamur, biji slaty, biji berserangga, biji berkecambah)

### 7.7.1 Prinsip

Pengamatan secara visual bagian dalam biji kakao yang dipotong memanjang melalui bagian sisi tipisnya terhadap adanya biji cacat.

### 7.7.2 Peralatan

- pisau tipis/cutter yang tajam dan berujung tajam;
- talenan.

### 7.7.3 Prosedur

- siapkan contoh uji sebanyak 300 biji diambil secara acak;
- potonglah memanjang dengan pisau/cutter melalui bagian sisi tipis pada talenan; dan amati satu persatu adanya biji fermentasi, biji berkapang, biji tidak terfermentasi, biji berserangga, biji berkecambah dan biji ungu yang tampak sesuai definisi berikut.
- khusus dalam penentuan biji slaty, apabila terdapat keraguan terhadap warna, sebaiknya keping biji tersebut digigit dan dicicipi, rasa pahit dan sepat yang ditimbulkan menandakan biji slaty;
- pisahkan biji-biji cacat (biji berkapang, biji slaty, biji berserangga, biji berkecambah) menurut jenis cacatnya dan hitunglah jumlahnya;
- apabila pada suatu biji terdapat lebih dari pada satu jenis cacat, maka biji tersebut



- dianggap mempunyai jenis cacat yang terberat sesuai dengan tingkat resiko yang ditimbulkan; tingkatan tersebut adalah: jamur, serangga, kecambah dan biji yang slaty
- f) apabila ditemukan adanya biji pipih yang saling melekat, maka biji tersebut dipisahkan kemudian dikategorikan sesuai jenis cacatnya;
  - g) cara menyatakan hasil.

Kadar masing-masing biji cacat dinyatakan dalam persentase biji per biji dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\frac{M_1}{M_0} \times 100 \%$$

dengan pengertian:

$M_0$  adalah jumlah contoh uji (300 biji kakao);

$M_1$  adalah jumlah masing-masing biji cacat

## 8 Syarat lulus uji

Biji kakao dinyatakan lulus uji apabila memenuhi persyaratan dalam syarat mutu pada Tabel 1 dan Tabel 2.

## 9 Syarat penandaan

Di bagian luar kemasan menggunakan bahan cat berpelarut air yang tidak luntur dan non toksik, jelas terbaca antara lain:

- Produksi Indonesia.
- Nama barang/no. kemasan/kode partai (lot).
- Jenis mutu.
- Nama/kode/eksportir/importir.
- Berat kotor/berat bersih.
- Tujuan.

## 10 Pengemasan

Biji kakao dikemas menggunakan kemasan karung goni yang baru, bersih, non toksik, bebas hama dan bau asing. Kemasan dijahit rapat dan kuat dengan berat bersih maksimum setiap karung 62,50 kg atau 16 karung per ton atau cara lain bila ada persetujuan antara pembeli dan penjual.

## 11 Penyimpanan

Untuk memudahkan pengambilan contoh, partai barang disusun dalam stapelan dengan tinggi maksimum 16 karung, jarak antar staple 60 cm, jarak stapel dengan dinding gudang 80 cm\*.

## 12 Rekomendasi atau pengujian tambahan

Apabila pembeli memerlukan pengujian lain yang telah disepakati antara pembeli dan penjual, disediakan beberapa cara uji tambahan yang tercantum dalam lampiran standar ini. Hasil uji tersebut tidak menjadi syarat lulus uji standar ini.



**Lampiran A**  
(normatif)  
**Penentuan kadar kulit dan kadar keping biji**

**A.1 Prinsip**

Pemisahan secara visual dan penimbangan.

**A.2 Peralatan**

- a) kaca arloji/cawan plastik/cawan aluminium;
- b) neraca analisis ketelitian 0,01 g

**A.3 Prosedur**

- a) timbang contoh uji dari biji kakao yang masih utuh kulitnya, sebanyak  $\pm 100$  g;
- b) kemudian pisahkan kulit dari keping bijinya dan pindahkan kulit dan keping tersebut ke dalam kaca arloji/cawan yang berlainan yang telah diketahui bobotnya;
- c) timbang masing-masing kaca arloji/cawan yang berisi kulit dan keping biji;
- d) cara menyatakan hasil:

kadar kulit dan kadar keping biji masing-masing dinyatakan dalam persentase bobot per bobot dengan perhitungan sebagai berikut.

$$\frac{(M_2 - M_1)}{M_0} \times 100 \%$$

dengan pengertian:

$M_0$  adalah bobot contoh uji, dinyatakan dalam gram;

$M_1$  adalah bobot kaca arloji/cawan kosong, dinyatakan dalam gram;

$M_2$  adalah bobot kaca arloji/cawan dan kulit/keping biji, dinyatakan dalam gram.



**Lampiran B**  
(normatif)  
**Penentuan kadar lemak total**

**B.1 Prinsip**

Ekstraksi lemak biji kakao dengan menggunakan pelarut organik non polar (petroleum benzen 40 °C sampai dengan 60 °C), yang sebelumnya dihidrolisis dengan HCl.

**B.2 Peralatan**

- a) neraca analisis kapasitas 200 g, ketelitian 0,1 mg;
- b) alat ekstraksi soxhlet lengkap;
- c) alat penguapan pelarut (rotary vacuum evaporator);
- d) timbal ekstraksi atau selongsong kertas saring;
- e) penangas air;
- f) oven;
- g) labu didih dasar rata kapasitas 250 ml;
- h) gelas piala;
- i) kaca arloji.

**B.3 Bahan kimia**

- a) asam klorida (HCl), 25 % b/b (=1,12):  
Campur 2 volume dari HCl 36 % dengan 1 volume dari air.
- b) petroleum benzen, titik didih 30 °C sampai dengan 60 °C;
- c) larutan perak nitrat (AgNO<sub>3</sub>) 0,1 N.

**B.4 Prosedur****B.4.1 Persiapan contoh**

- a) kupas kulit luar contoh uji biji kakao, kemudian giling sampai ukuran partikel maksimum 150 mikron;
- b) timbang 3 g sampai dengan 5 g contoh uji tersebut dengan ketelitian mendekati 1 mg ke dalam gelas piala 300 ml sampai dengan 500 ml.

**B.4.2 Hidrolisis**

- a) tambahkan 45 ml air suling mendidih, 55 ml HCl ke dalam gelas piala yang berisi contoh uji dan beberapa butir batu didih; kocok dan tutup gelas piala tersebut dengan kaca arloji dan didihkan perlahan-lahan tepat 15 menit;
- b) bilas kaca arloji dengan 100 ml air suling dan masukkan air pencucian tersebut ke dalam gelas piala; kemudian saring endapan melalui kertas saring yang bebas lemak;
- c) bilas gelas piala tersebut 3 kali dengan air suling melalui kertas saring dan pencucian diteruskan sehingga bebas Cl (tidak memberikan endapan putih AgCl dengan penambahan 1 tetes sampai dengan 3 tetes AgNO<sub>3</sub>);
- d) pindahkan kertas saring beserta isinya ke dalam timbal ekstraksi atau selongsong kertas saring yang bebas lemak; sumbatlah *glasswool*/kapas di atas kertas saring dan keringkan selama 6 jam sampai dengan 18 jam pada suhu 100 °C sampai dengan 101 °C; keringkan juga gelas piala yang pertama dan kaca arloji.



### B.4.3 Ekstraksi lemak

- keringkan selama satu (1) jam labu didih yang berisi beberapa butir batu didih; dinginkan dan timbang hingga bobot tetap (dengan ketelitian mendekati 0,1 mg); sambungkan dengan alat ekstraksi soxhlet;
- masukkan timbal ekstraksi atau selongsong kertas saring ke dalam soxhlet (sebaiknya timbal ditopang dengan per atau *glass bead* untuk meyakinkan daya kerja yang efisien dari syphon);
- bilas gelas piala dan kaca arloji yang telah dikeringkan dengan 150 ml petroleum benzen beberapa kali dan tuangkan ke dalam labu; refluks selama 4 jam dengan kecepatan ekstraksi kira-kira 3 tetes per detik;
- setelah ekstraksi selesai, keluarkan timbal ekstraksi atau selongsong kertas saring; uapkan pelarut petroleum eter dengan alat penguapan atau dengan memanaskan labu di atas penangas air;
- keringkan labu beserta lemak di dalam oven pada suhu 100 °C sampai 101 °C, dinginkan dan timbang; sisa pelarut terakhir setelah pengeringan diuapkan dengan menghembuskan udara melalui labu didih;
- ulangi pengeringan sampai perbedaan penimbangan berat lemak yang dilakukan berturut-turut kurang dari 0,05 %;
- cara menyatakan hasil kadar lemak dinyatakan dalam persentase bobot per bobot dan dihitung dalam bobot kering dengan perhitungan sebagai berikut.

$$\frac{100 (M_2 - M_1)}{M_0} \times \frac{100}{(100 - K_A)}$$

dengan pengertian:

$M_0$  adalah bobot contoh uji, dinyatakan dalam g;

$M_1$  adalah bobot labu didih dan batu didih, dinyatakan dalam g;

$M_2$  adalah bobot labu didih, batu didih dan lemak, dinyatakan dalam g;

$K_A$  adalah kadar air contoh uji.



**Lampiran C**  
(normatif)  
**Penentuan kadar asam lemak bebas (sebagai asam oleat)**

**C.1 Prinsip**

Lemak hasil ekstraksi dilarutkan ke dalam etanol panas dan kemudian dititrasi dengan larutan alkali (NaOH atau KOH 0,1 N).

**C.2 Peralatan**

- neraca analisis kapasitas 200 g dengan ketelitian 0,1 mg;
- oven listrik yang berventilasi dengan pengatur suhu;
- hot plate dengan kontrol termostat (diperengkapi dengan magnetic);
- buret berkapasitas 25 ml dengan pembagian skala 0,05 ml;
- erlenmeyer berkapasitas 250 ml, 500 ml;
- gelas ukur berkapasitas 50 ml.

**C.3 Bahan kimia**

- etanol 95 % yang sudah dinetralkan;
- NaOH atau KOH 0,1 N;
- indikator fenolftalein (larutan 1 % dalam etanol 95 %).

**C.4 Prosedur**

- timbang seluruh lemak yang diperoleh dari pengujian kadar lemak total ke dalam erlenmeyer; tambahkan 50 ml etanol 95 % yang sudah dinetralkan;
- kemudian panaskan dengan pendingin tegak di atas penangas air; setelah mendidih, tambahkan beberapa tetes indikator fenolftalein dan titrasi dalam keadaan panas dengan larutan NaOH atau KOH 0,1 N sampai titik akhir berwarna merah muda dan bertahan paling sedikit selama 30 detik.

**C.5 Cara menyatakan hasil**

Asam lemak bebas dihitung sebagai asam oleat dan dinyatakan dalam persentase bobot per bobot dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\frac{28,2 \times V \times N}{M} \times \frac{100}{(100-K_A)}$$

dengan pengertian:

- V adalah volume larutan NaOH atau KOH 0,1 N yang diperlukan untuk menitrasi, dinyatakan dalam ml;  
 N adalah normalitas larutan NaOH atau KOH;  
 M adalah bobot lemak contoh uji, dinyatakan dalam g;  
 K<sub>A</sub> adalah kadar air contoh uji.



**Lampiran D**  
(normatif)  
**Penentuan pH keping biji**

**D.1 Prinsip**

Pengukuran pH contoh uji yang telah dipersiapkan dalam larutan dengan menggunakan pH-meter yang telah distandarkan dengan larutan penyangga baku (*standard buffer*).

**D.2 Peralatan**

- a) pH-meter dengan elektroda gelas dan kalomel yang mempunyai ketelitian 0,05;
- b) blender;
- c) gelas piala.

**D.3 Bahan kimia**

- a) larutan penyangga baku pH 4,0;
- b) larutan penyangga baku pH 7,0.

**D.4 Prosedur**

- a) siapkan alat pH-meter, periksa titik nol dan aliran listrik sesuai dengan buku instruksi dan standarkan dengan menggunakan larutan penyangga baku pH 4,0 dan pH 7,0;
- b) ambil contoh uji sebanyak 12 biji sampai dengan 20 biji, pisahkan kulit luarnya dan kemudian giling dengan menggunakan blender;
- c) timbang contoh uji tersebut sebanyak  $\pm 10$  g ke dalam gelas piala, tambahkan 90 ml air suling panas ( $70^{\circ}\text{C}$  sampai dengan  $80^{\circ}\text{C}$ ), aduk perlahan-lahan sampai terbentuk suspensi yang harus bebas dari gumpalan-gumpalan;
- d) saring dan dinginkan filtratnya sampai suhu kamar ( $27 \pm 2$ )  $^{\circ}\text{C}$  dan tentukan pH filtrat secepat mungkin pada suhu tersebut.

**D.5 Cara menyatakan hasil**

Nyatakan hasil sesuai dengan pembacaan yang ditunjukkan oleh pH-meter untuk filtrat tersebut.



**Lampiran E**  
(normatif)  
**Penentuan cemaran logam cadmium (Cd)**

**E.1 Prinsip**

Penentuan cemaran logam Cd dengan metode spektrofotometer.

**E.2 Peralatan**

- a) neraca analitik kapasitas 200 g dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) cawan platina/silika;
- c) spektrofotometer serapan atom dengan lampu Cd;
- d) tanur listrik;
- e) oven mempunyai ventilasi;
- f) labu ukur kapasitas 100 ml dan 1.000 ml.

**E.3 Bahan kimia**

- a) asam klorida (HCl) 5 N dan HCl (1+1);
- b) asam nitrat (HNO<sub>3</sub>) 1,0 N;
- c) pembuatan larutan standar cadmium (Cd);  
Pereaksi:
  - Asam klorida, HCl (1+1);
  - Asam klorida, HCl 5 N;
  - Larutan baku Cd.

**1) larutan sediaan 100 µ Cd/ml**

Larutkan 1,000 g logam Cd dalam 50 ml HCl (1+1) atau HNO<sub>3</sub> (1+1) dalam labu ukur 1 liter, encerkan dan tepatkan sampai tanda garis dengan air suling.

**2) larutan intermediat, 100 µ Cd/ml**

Pipet 10,0 ml larutan sediaan dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml. Kemudian tambahkan 20 ml HCl 5 N, encerkan dan tepatkan sampai tanda garis.

**3) larutan kerja**

Pipet 0 ml ; 2 ml ; 6 ml ; 8 ml larutan intermediat, ke dalam labu ukur 100 ml, asamkan dengan 20 ml HCl 5 N, encerkan dan tepatkan sampai tanda garis (larutan ini mengandung 0 µ Cd/ml ; 2 µ Cd/ml ; 4 µ Cd/ml ; 6 µ Cd/ml ; 8 µ Cd/ml).

**E.4 Prosedur**

- a) timbang dengan seksama contoh sebanyak 10 g dalam cawan platina/silika;
- b) keringkan selama 1 jam dalam oven;
- c) masukkan contoh yang telah dikeringkan ke dalam tanur yang telah diatur suhunya 250 °C;
- d) perlahan-lahan naikan suhu (setiap kenaikan 50 °C) menjadi 350 °C sampai tidak terbentuk asap lagi;
- d) naikan suhu menjadi 500 °C dengan setiap kenaikan kira-kira 75 °C (contoh tidak boleh terbakar) dan abukan selama 16 jam (semalam);
- e) keluarkan cawan dari dalam tanur dan biarkan menjadi dingin;
- f) abu harus putih dan pada dasarnya harus bebas karbon;
- g) jika abu masih mengandung kelebihan partikel-partikel karbon (misalnya abu agak berwarna abu-abu atau keabu-abuan), basahkan abu dengan air sedikit mungkin,



- diikuti penambahan  $\text{HNO}_3$  beberapa tetes demi tetes (0,5 ml sampai dengan 3,0 ml);
- h) keringkan di atas lempeng pemanas;
  - i) masukkan ke dalam tanur pada suhu  $250^\circ\text{C}$  dan perlahan-lahan naikan suhu menjadi  $500^\circ\text{C}$ , lanjutkan pemanasan selama 60 menit sampai dengan 120 menit;
  - j) jika perlu penambahan  $\text{HNO}_3$  ulangi lagi sehingga didapat residu/abu bebas karbon;
  - k) larutkan abu dalam 5,0 ml  $\text{HNO}_3$  1,0 N, hangatkan di atas penangas air atau lempeng/plat pemanas selama 2 menit sampai dengan 3 menit dan saring ke dalam labu ukur 50 ml;
  - l) ulangi pencucian residu dengan penambahan 5,0 ml  $\text{HNO}_3$  1,0 N, saring dan jadikan satu dengan saringan sebelumnya, encerkan dengan  $\text{HNO}_3$  0,1 N sampai 50 ml;
  - m) buat kurva baku dengan memplot serapan dari masing-masing baku yang dikoreksi dengan blanko; terhadap konsentrasi baku dalam  $\mu\text{g/ml}$  butil asetat, konsentrasi baku dalam butil asetat ialah empat kali dari baku dalam air;
  - n) tetapkan konsentrasi logam dalam contoh dari kurva baku menggunakan serapan contoh yang telah dikurangi dengan blanko pereaksi (jika digunakan blanko pereaksi).

#### E.5 Cara menyatakan hasil

$$\mu\text{g/g} = \frac{\mu\text{g logam/ml dari kurva baku}}{\text{g contoh} \times 20 \times 50}$$





**Lampiran F**  
(normatif)  
**Penetapan kadar besi (Fe), tembaga (Cu) dan seng (Zn)**

**F.1 Prinsip**

Penetapan kadar besi, tembaga dan seng secara spektrofotometer serapan atom setelah contoh uji diabukan pada suhu 525 °C dan dilarutkan dalam asam klorida.

**F.2 Bahan kimia**

- a) asam nitrat (1:1);
- b) asam klorida (1:1);
- c) larutan baku (Fe, Cu dan Zn).

**F.3 Peralatan**

- a) spektrofotometer serapan atom;
- b) neraca analitik kapasitas 200 g, ketelitian 0,01 mg;
- c) cawan platina/silika;
- d) penangas air;
- e) tanur dengan suhu yang dapat diatur;
- f) labu ukur 100 ml.

**F.4 Prosedur**

- a) timbang 10 g contoh uji ke dalam cawan silika, kemudian panaskan di atas api langsung dengan hati-hati sampai contoh uji mengarang (suhu pemanasan tidak boleh terlalu tinggi sehingga terjadi pemijaran); pindahkan ke dalam tanur untuk pengabuan pada suhu 500 °C selama 2 jam;
- b) keluarkan cawan dan dinginkan, kemudian tambahkan 1 ml sampai dengan 2 ml air bebas mineral dan 3 ml asam nitrat (1:1); panaskan di atas penangas air dan setelah kering, panaskan di atas nyala api dengan hati-hati pada suhu rendah sehingga semua nitrat hilang; masukkan kembali ke dalam tanur dengan suhu 525 °C selama 1 jam;
- c) dinginkan dan larutkan abu yang diperoleh dengan 10 ml asam klorida (1:1) dengan pertolongan pemanasan di atas penangas air selama beberapa menit; kemudian pindahkan ke dalam labu takar 100 ml dengan air bebas mineral dan tetapkan volumenya;
- d) buat masing-masing larutan baku Fe, Cu dan Zn dengan kadar yang dikehendaki dalam labu ukur 100 ml yang berisi 10 ml asam klorida (1:1) dan tambahkan air bebas mineral hingga tanda batas;
- e) ukuran serapan larutan contoh uji dan masing-masing larutan baku serta catat serapannya pada alat spektrofotometer serapan atom; buat kurva baku dan bandingkan terhadap serapan contoh; hitung kadar (ml/l) larutan contoh uji.

**F.5 Cara menyatakan hasil**

Hitung kadar Fe, Cu dan Zn dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Fe/Cu/Zn (ml/l)} = \frac{A_c}{A_b} \times \text{baku (ml/l)} \times \frac{V}{W}$$

dengan pengertian:

- $A_c$  adalah serapan larutan contoh uji yang diperoleh;
- $A_b$  adalah serapan larutan baku yang diperoleh;
- $V$  adalah volume larutan contoh uji;
- $W$  adalah bobot contoh uji, dinyatakan dalam g;
- baku (ml/l) adalah kadar baku yang mendekati contoh uji.



## Lampiran G (normatif) Penetapan kadar timbal (Pb)

### G.1 Prinsip

Penetapan kadar timbal secara spektrofotometer serapan atom dilakukan setelah contoh uji didekstruksi basah dengan campuran asam nitrat dan asam sulfat.

### G.2 Bahan kimia

- a) asam nitrat;
- b) asam sulfat;
- c) hidrogen peroksida 30%;
- d) larutan baku Pb.

### G.3 Peralatan

- a) spektrofotometer serapan atom;
- b) neraca analitik kapasitas 200 g, ketelitian 0,1 mg;
- c) labu Kjedaahl;
- d) pemanas;
- e) labu ukur 100 ml.

### G.4 Prosedur

- a) timbang 10 g contoh uji ke dalam labu Kjedaahl 500 ml, tambahkan campuran asam nitrat dan asam sulfat (1:1); kemudian panaskan dengan api kecil, dijaga agar tidak mengarang; nyala api dibesarkan, agar merata lalu digoyangkan perlahan-lahan; pemanasan dilanjutkan sampai diperoleh larutan contoh yang jernih;
- b) tambahkan hidrogen peroksida 30 %, dipanaskan dengan api kecil, penambahan hidrogen peroksida dilakukan berulang-ulang sampai larutan menjadi jernih berwarna kuning muda atau tidak berwarna; setelah dingin, encerkan dengan air bebas mineral atau air suling ke dalam labu ukur 25 ml; tepatkan sampai tanda garis;
- c) kerjakan blanko dengan menggunakan 5 ml sampai dengan 10 ml air bebas mineral atau air suling seperti perlakuan terhadap contoh;
- d) pembuatan larutan baku:
  - **Larutan baku timbal sediaan**  
Timbang 1,598 g Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> anhidrat, larutkan dengan asam nitrat pekat, encerkan dengan air bebas mineral atau air suling dalam labu ukur 1.000 ml dan tepatkan sampai tanda garis. Satu (1) ml larutan mengandung 1 mg Pb (1.000 mg/Pb).
  - **Larutan baku kerja**  
Encerkan 10 ml larutan baku sediaan ke dalam labu ukur 100 ml dengan air suling sehingga larutan menjadi 25 mg/l Pb.
  - **Larutan baku seri**  
Pipet 1,0 ml ; 2,0 ml ; 3,0 ml ; 4,0 ml dan 5,0 ml larutan baku kerja ke dalam labu ukur 100 ml.
- e) ukur serapan larutan contoh uji dan masing-masing larutan baku serta catat serapannya, pada spektrofotometer serapan atom; buat kurva baku dan bandingkan terhadap serapan contoh; hitung kadarnya (mg/l) larutan contoh uji.



### G.5 Cara menyatakan hasil

Hitung kadar Pb dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Pb (mg/l)} = \frac{A_c}{A_b} \times \text{baku (mg/l)} \times \frac{V}{W}$$

dengan pengertian:

- $A_c$  adalah serapan larutan contoh uji yang diperoleh;
- $A_b$  adalah serapan larutan baku yang diperoleh;
- $V$  adalah volume larutan contoh uji;
- $W$  adalah bobot contoh uji, dinyatakan dalam gram;
- baku (mg/l) adalah kadar baku yang mendekati contoh uji.





## Lampiran H (normatif) Penetapan kadar raksa (Hg)

### H.1 Prinsip

Contoh uji didekstruksi menggunakan campuran asam sulfat dengan hidrogen peroksida. Dengan penambahan pereduksi maka raksa (bentuk gas) akan dibebaskan dan ditetapkan dengan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala.

### H.2 Bahan kimia

- a) asam nitrat 65 %;
- b) asam sulfat 97 %;
- c) larutan pereduksi:  
15 g hidroksilamin sulfat, 15 g natrium klorida, 25 g stano klorida dimasukkan ke dalam erlenmeyer ditambahkan 100 ml air bebas mineral serta 50 ml asam sulfat. Panaskan di atas penangas air sampai larut sempurna, dinginkan, pindahkan ke dalam labu ukur 500 ml kemudian tambahkan air bebas mineral sampai tepat tanda.

### H.3 Peralatan

- a) spektrofotometer serapan atom lengkap dengan mercury kit;
- b) neraca analitik kapasitas 200 g, ketelitian 0,1 mg;
- c) labu ukur 20 ml, 50 ml, dan 100 ml;
- d) penangas air.

### H.4 Prosedur

- a) penyiapan contoh uji:  
Timbang contoh uji 1 g sampai dengan 2 g ke dalam labu deekstruksi 100 ml dan tambahkan 5 ml asam nitrat dan 4 ml asam sulfat kemudian hubungkan dengan pendingin. Panaskan labu sampai uap hilang kemudian dinginkan.
- b) pindahkan ke dalam labu erlenmeyer dengan pertolongan air bebas mineral hingga diperoleh volume 100 ml; kerjakan blangko tanpa contoh seperti perlakuan pada contoh uji;
- c) pembuatan larutan baku:  
Timbang dengan teliti 1,354 g  $\text{HgCl}_2$ , larutkan dalam air bebas mineral, tambahkan 30 ml asam sulfat dan encerkan dengan air bebas mineral sampai mencapai volume 1.000 ml (tiap ml larutan mengandung 1 mg Hg). Pipet 5 ml dari larutan tersebut ke dalam labu ukur 500 ml dan tambahkan air hingga tanda batas (tiap ml larutan mengandung 10  $\mu\text{g}$  Hg). Kemudian pipet kembali 5 ml larutan kedua ke dalam labu ukur 500 ml dan tambahkan air hingga tanda batas (tiap ml larutan mengandung 0,1  $\mu\text{g}$  Hg).
- d) tambahkan 20 ml larutan pereduksi ke dalam setiap 100 ml larutan blangko, contoh uji dan seri larutan baku raksa yang diukur; baca serapan pada alat spektrofotometer serapan atom dengan panjang gelombang 253,3 nm; setiap penambahan larutan baku harus segera diperiksa atau diukur dengan cepat; bandingkan kadar baku raksa dengan contoh uji;

### H.4 Cara menyatakan hasil

Hitung kadar raksa dalam contoh uji dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar raksa } \mu\text{g/g} = \frac{A_c - b}{A_b} \times C \times \frac{f}{g}$$

dengan pengertian:

$A_c$  adalah serapan dari contoh uji;  
 $A_b$  adalah serapan dari baku raksa;  
 $b$  adalah tinggi puncak dari blangko;

$f$  adalah faktor pengenceran;  
 $g$  adalah bobot contoh dinyatakan dalam g;  
 $s$  adalah kadar baku, dinyatakan dalam  $\mu\text{g}$ .



**Lampiran I**  
(normatif)  
**Penetapan kadar arsen (As)**

**I.1 Prinsip**

Contoh uji didekstruksi menggunakan campuran asam sulfat dengan hidrogen peroksida. Arsen segera ditetapkan dengan penambahan larutan natrium borohidrida dengan menggunakan spektrofotometer serapan atom memakai sistem hidrida pada panjang gelombang 193,7 nm.

**I.2 Bahan kimia**

- a) asam sulfat (1,84);
- b) hidrogen peroksida 30 %;
- c) larutan natrium borohidrida ( $\text{NaBH}_4$ ) 5 % dalam 1 % larutan NaOH kemudian disaring menggunakan kertas saring yang berpori 0,45  $\mu\text{m}$ ;
- d) asam klorida encer (150 ml HCl dalam 1.000 ml air);
- e) larutan baku arsen ( $\text{As}^{5+}$ ), tiap ml mengandung 100  $\mu\text{g}$  As; larutan 0,132 g  $\text{As}_2\text{O}_3$  kering dalam 20 ml larutan NaOH 30 %, tambahkan perlahan-lahan sambil diaduk 100 ml air dan kemudian 10 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat; encerkan dengan air bebas mineral sampai batas pada labu ukur 1.000 ml (tiap ml larutan mengandung 0,1 mg As atau 100  $\mu\text{g}$  As);
- f) larutan kalium iodida 16 %.

**I.3 Peralatan**

- a) spektrofotometer serapan atom lengkap dengan hidrida kit;
- b) neraca analitik kapasitas 200 g, ketelitian 0,1 mg;
- c) labu ukur 10 ml, 100 ml dan 1.000 ml;
- d) labu Kjedaahl.

**I.4 Prosedur**

- a) timbang dengan teliti 2 g sampai dengan 5 g contoh uji ke dalam labu Kjedaahl yang berisi beberapa butir batu didih; kemudian destruksi dengan 5 ml hidrogen peroksida dan 2,5 ml asam sulfat secara hati-hati hingga diperoleh larutan yang jernih; apabila belum jernih tambahkan  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian panaskan kembali, kerjakan berulang-ulang hingga larutan menjadi jernih;
- b) dinginkan, tambahkan 2 kali 5 ml air bebas mineral dengan pemanasan hingga terbentuk uap/asam putih; dinginkan kembali dan pindahkan ke dalam labu ukur 10 ml dan tepatkan sampai tanda batas; kerjakan blangko tanpa contoh uji seperti perlakuan pada contoh uji;
- c) pembuatan larutan baku arsen:  
Larutkan baku arsen ( $\text{As}^{5+}$ ), tiap ml mengandung 100  $\mu\text{g}$  As. Larutkan 0,132 g  $\text{As}_2\text{O}_3$  kering dalam 20 ml larutan NaOH 30 %, tambahkan perlahan-lahan sambil diaduk 100 ml air dan kemudian 10 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Encerkan dengan air bebas mineral sampai mencapai batas pada labu ukur 1.000 ml (tiap ml larutan mengandung 0,1 mg As atau 100  $\mu\text{g}$  As).
- d) pipet 2,5 ml larutan contoh uji ke dalam tabung khusus untuk pemeriksaan arsen menggunakan spektrofotometer serapan atom dan tambahkan 10 ml HCl 15 %, 0,25 ml larutan KI 16 %; segera ukur serapannya setelah ditambahkan 2 ml  $\text{NaBH}_4$  dengan panjang gelombang 193,7 nm; kerjakan blangko dan contoh uji dengan perlakuan sama;



### I.5 Cara menyatakan hasil

Hitung kadar arsen dalam contoh uji dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar raksa } \mu\text{g/g} = \frac{A_c - b}{A_b} \times C \times \frac{f}{g}$$

dengan pengertian:

$A_c$  adalah serapan dari contoh uji;

$A_b$  adalah serapan dari baku raksa;

$b$  adalah serapan dari blangko contoh uji dan baku;

$C$  adalah kadar baku, dinyatakan dalam  $\mu\text{g}$ ;

$F$  adalah faktor pengenceran;

$g$  adalah bobot contoh, dinyatakan dalam g.





**Lampiran J**  
(normatif)  
**Penentuan kapang dan khamir**

**J.1 Prinsip**

Pertumbuhan kapang dan khamir dalam media yang cocok, setelah diinkubasikan pada suhu 25 °C atau suhu kamar selama 5 menit.

**J.2 Pembenihan dan pengenceran**

- a) peptone dilution fluid atau peptone water;
- b) plate count agar atau potato dextrose agar atau malt extract agar;
- c) larutan kloramfenikol 10.000 ppm steril.

**J.3 Peralatan**

- a) cawan petri gelas (15 x 100 ml) atau plastik (15 x 90 mm), disterilkan;
- b) pipet 1 ml ; 1,1 ml ; 5 ml ; 10 ml dan 11 ml berskala;
- c) botol pengenceran (100 ml) gelas bersilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup aliran dari plastik;
- d) penangas air dengan termostat untuk mengatur suhu agar (45 ± 1) °C;
- e) lemari pengering (25 ± 1) °C;
- f) alat penghitung koloni bakteri;
- g) botol-botol pengenceran;
- h) mikroskop.

**J.4 Prosedur persiapan contoh uji**

- a) Timbang 50 g contoh uji ke dalam kantong plastik yang steril. Tuangkan 450 ml larutan pengencer (peptone water 0,1 %) dengan cara aseptik, kemudian blender dengan alat stomacher selama 2 menit. Masukkan ke dalam botol yang steril (pengenceran 10<sup>-1</sup>).
- b) Dengan setiap kali menggunakan pipet steril yang berbeda, buatlah pengenceran tingkat 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> dari contoh yang telah dipersiapkan (J.4.a). Cara melakukan pengenceran 10 kali ialah dengan mencampur 10 ml dari tingkat pengenceran yang sebelumnya dengan 90 ml zat pengencer. Semua tingkat pengenceran dikocok 25 kali dengan panjang busur 30 cm selama 7 detik.
- c) Kocok tiap botol pengenceran untuk melarutkan bahan yang mengendap, lalu pipet 1 ml dari tiap pengenceran untuk dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah diberi label (lakukan dalam duplo).
- d) Tiap cawan petri diisi dengan 12 ml sampai dengan 15 ml plate count agar (dinginkan 40 °C sampai dengan 44 °C) dalam waktu 15 menit sejak pengenceran pertama dibuat. Untuk setiap deretan pengenceran, tuangkan pula agar dengan zat pengencer sebagai inokulum ke dalam cawan petri untuk digunakan sebagai kontrol.
- e) Inokulum dan medium agar dicampur merata dengan menggerakkan cawan petri ke belakang, ke depan dan memutar pada permukaan datar.
- f) Biarkan agarnya membeku, lalu cawan petri disusun secara terbalik dan disimpan pada 25 °C selama lima (5) hari.
- g) Setelah massa inkubasi, dengan menggunakan alat penghitung koloni bakteri atau tally register, dihitung jumlah koloni per cawan petri pada semua cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan catat hasilnya untuk tiap tingkat pengenceran.



## J.5 Penyajian hasil uji

Rata-ratakan hasilnya dan laporkan sebagai jumlah kapang/khamir per gram contoh uji. Jumlah kapang/khamir per gram = rata-rata jumlah koloni per cawan dikalikan dengan faktor pengenceran.

**CATATAN 1** Koloni kapang biasanya buram dan berbulu, sedangkan koloni khamir berwarna putih dan licin (berbau asam).

**CATATAN 2** Tegaskan koloni dengan pemeriksaan di bawah mikroskop sehingga yakin bahwa koloni tersebut adalah kapang dan atau khamir.

**CATATAN 3** Cara melaporkan dan mencatat hasil yang dihitung koloninya hanya cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni bakteri per cawan. Bila jumlah koloni percawan tidak berada di antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan terdapat satu atau lebih cawan petri yang mengandung lebih dari 250 koloni, catatlah sebagai taksiran; bila cawan petri dari semua pengenceran mengandung kurang dari 25 koloni, laporkan jumlah rata-rata koloni yang dihitung serta faktor pengencerannya, umpamanya: bila faktor pengenceran adalah 1 : 10 dan jumlah koloni rata-rata dari dua cawan petri adalah 20 koloni, laporkan sebagai 200, juga bila tak terdapat koloni sama sekali pada tingkat pengenceran ini, nyatakan hasilnya < 10. Cara penulisan ini menyatakan suatu taksiran : bila semua cawan petri mengandung lebih dari 250 koloni, buatlah suatu taksiran dari jumlah koloni tersebut, umpama bila faktor pengenceran adalah 1 : 1.000 dan jumlah koloni rata-rata dari dua cawan petri adalah 523, laporkan sebagai 520.000.

**CATATAN 4** Cara membulatkan angka: setiap angka besar harus dibulatkan sampai pada dua satuan angka yang berarti. Bila membulatkan maka angka kedua dijadikan satu angka lebih besar hanya bila angka ketiga dari kiri adalah 5 atau lebih besar dari 5, dan angka tersebut diganti menjadi nol. Bila angka ketiga adalah 4 atau kurang dari 4, angka ketiga diganti dengan nol dan angka kedua dipertahankan, umpama 528 menjadi 530 atau 523 menjadi 520.



**Lampiran K**  
(normatif)  
**Penentuan jumlah bakteri total (angka lempeng total)**

**K.1 Prinsip**

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang cocok selama 24 jam sampai dengan 48 jam pada suhu  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

**K.2 Perbenihan dan pengenceran**

- a) peptone water (PW);
- b) plate count agar (PCA).

**K.3 Peralatan**

- a) cawan petri gelas (15 x 100 ml) atau plastik (15 x 90 mm), disterilkan;
- b) pipet 1 ml; 1,1 ml; 5ml; 10 ml dan 11 ml berskala;
- c) botol pengenceran (100 ml) gelas bersilikat yang resisten, dengan sumbat karet atau tutup uliran dari plastik;
- d) penangas air dengan termostat untuk mengatur suhu agar,  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;
- e) lemari pengering,  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;
- f) alat penghitung koloni bakteri, model dark field guebec atau yang sejenis, dengan sumber cahaya dan gridplate;
- g) botol-botol pengenceran;
- h) otoklaf.

**K.4 Prosedur**

- a) persiapan contoh uji:  
Timbang 50 g contoh uji ke dalam kantong plastik yang steril. Tuangkan 450 ml larutan pengencer (peptone water 0,1 %) dengan cara aseptik, kemudian blender dengan alat stomacher selama 2 menit. Masukkan ke dalam botol yang steril (pengenceran  $10^{-1}$ ).
- b) dengan setiap kali menggunakan pipet steril yang lain, buatlah pengenceran tingkat  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  dari contoh yang telah dipersiapkan a); cara melakukan pengenceran sepuluh kali ialah dengan mencampur 10 ml dari tingkat pengenceran yang sebelumnya dengan 90 ml zat pengencer; semua tingkat pengenceran dikocok 25 kali dengan panjang busur 30 cm selama 7 detik;
- c) kocok tiap botol pengenceran untuk melarutkan bahan yang mengendap, lalu pipet 1 ml dari setiap pengenceran untuk dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah diberi label (lakukan dalam duplo);
- d) kemudian tiap cawan petri diisi dengan 12 ml sampai dengan 15 ml plate count agar (dinginkan  $40 ^\circ\text{C}$  sampai dengan  $44 ^\circ\text{C}$ ) dalam waktu 15 menit sejak pengenceran pertama dibuat; untuk setiap deretan pengenceran, tuangkan pula agar dengan zat pengencer sebagai inokulum ke dalam cawan petri untuk digunakan sebagai kontrol;
- e) inokulum dan medium agar dicampur merata dengan menggerakkan cawan petri ke belakang, ke depan dan memutar pada permukaan datar;
- f) biarkan agarnya membeku, lalu cawan petri disusun secara terbalik dan disimpan pada  $35 ^\circ\text{C}$  selama  $(48 \pm 2)$  jam;
- g) setelah masa inkubasi, dengan menggunakan alat penghitung koloni atau tally register, dihitung jumlah bakteri per cawan petri pada semua cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan catat hasilnya untuk tiap tingkat pengenceran.



## K.5 Cara menyatakan hasil uji

Rata-ratakan hasilnya dan laporkan sebagai jumlah bakteri total per g contoh uji. Jumlah bakteri total per g = rata-rata jumlah koloni per cawan dikalikan dengan faktor pengenceran.

**CATATAN 1** Cara melaporkan dan mencatat hasil yaitu menghitung koloni hanya pada cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni per cawan. Bila jumlah koloni per cawan tidak berada di antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan terdapat satu atau lebih cawan petri yang mengandung lebih dari 250 koloni, catatlah sebagai taksiran: bila cawan petri dari semua pengenceran mengandung kurang dari 25 koloni, laporkan jumlah rata-rata koloni yang dihitung serta faktor pengencerannya, umpamanya: bila faktor pengenceran adalah 1 : 10 dan jumlah koloni rata-rata dari dua cawan petri adalah 20 koloni, laporkan sebagai 200, juga bila tak terdapat koloni sama sekali pada tingkat pengenceran ini, catat dan nyatakan sebagai < 10. Cara penulisan ini menyatakan suatu taksiran. Bila semua cawan petri mengandung lebih dari 250 koloni, buatlah suatu taksiran dari jumlah koloni tersebut, umpamanya: bila faktor pengenceran adalah 1 : 1.000 dan jumlah koloni rata-rata dari dua cawan petri adalah 523, laporkan sebagai 520.000.

**CATATAN 2** Cara membulatkan angka yaitu setiap angka besar harus dibulatkan sampai pada dua satuan angka yang berarti. Bila membulatkan maka angka kedua dijadikan satu angka lebih besar hanya bila angka ketiga dari kiri adalah 5 atau lebih besar dari 5, dan angka tersebut diganti menjadi nol. Bila angka ketiga adalah 4 atau kurang dari 4, angka ketiga diganti dengan nol dan angka kedua dipertahankan, umpama 528 menjadi 530 atau 523 menjadi 520.





**Lampiran L**  
(normatif)  
**Penentuan bakteri *coliform***

**L.1 Prinsip**

Pertumbuhan bakteri *Coliform* yang ditandai dengan terbentuknya gas dalam tabung Durham, setelah contoh uji diinkubasikan dalam pembenihan yang cocok pada suhu  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama 24 jam sampai 48 jam yang selanjutnya dirujuk kepada Tabel L.3 .

**L.2 Pembenihan dan pengencer**

- a) peptone water;
- b) lauryl sulphate tryptose (LST) broth;
- c) brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2 %.

**L.3 Peralatan**

- a) otoklaf;
- b) pipet 1 ml ; 1,1 ml ; 5 ml ; 10 ml dan 11 ml berskala;
- c) botol pengenceran (160 ml) gelas bersilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup uliran dari plastik;
- d) lemari pengencer (inkubator),  $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;
- e) tabung reaksi (16 x 150 mm) untuk diisi 10 ml medium;
- f) rak untuk tabung reaksi steril;
- g) jarum inokulasi, dengan diameter dalam sosok kira-kira 3 mm (ose);
- h) stomacher/blender;
- i) kantong plastik.

**L.4 Prosedur**

- a) presumptive test untuk bakteri *Coliform* (uji dugaan);
- b) persiapan contoh uji:  
Timbang 50 g contoh uji ke dalam kantong plastik yang steril. Tuangkan 450 larutan pengencer (peptone water 0,1 %) dengan cara aseptik, kemudian blender dengan alat stomacher selama 2 menit. Masukkan ke dalam botol yang steril (pengenceran  $10^{-1}$ ).
- c) dengan setiap kali menggunakan pipet steril yang berbeda, buatlah pengenceran tingkat  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , dan lebih tinggi bila perlu (dari contoh yang telah dipersiapkan a); semua tingkatan pengenceran dikocok 25 kali dengan panjang busur 30 cm selama 7 detik;
- d) tiga tabung dengan lauryl sulphate tryptose broth masing-masing diinokulasi dengan satu (1) ml dari setiap tingkat pengenceran; pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung; biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik; pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- e) inkubasi tabung-tabung tersebut selama  $(48 \pm 2)$  jam pada  $35 ^\circ\text{C}$ ;
- f) setelah  $(24 \pm 2)$  jam, periksa tabung-tabung tersebut terhadap pembentukan gas; ini adalah tabung-tabung yang positif;
- g) tabung-tabung yang negatif diinkubasikan lagi selama 24 jam;
- h) catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun, setelah inkubasi  $(48 \pm 2)$  jam, karena ini adalah presumptive test yang positif untuk bakteri *Coliform*;
- i) lakukan confirmed test bakteri *Coliform* (uji penegasan);  
Tabung LST yang positif dikocok secara hati-hati atau dicampur dengan cara memutar-mutar tabung.



- j) pindahkan satu mata ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung BGLB 2 % yang berlainan;
- k) inkubasikan tabung-tabung BGLB 2 % ini selama  $\pm 24$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ ;
- l) catat semua tabung BGLB yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan Angka Paling Mungkin (APM) pada Tabel L.3, tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama  $(48 \pm 2)$  jam pada  $35^{\circ}\text{C}$ ;
- m) laporkan sebagai APM bakteri *Coliform* per g.

**Tabel L.3 - APM / MPN per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran (0,1 g/ml ; 0,01 g/ml dan 0,001 g/ml contoh**

Tabung Yang Positif			APN/MPN	Tabung Yang Positif			MPN
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	0	0	9,1
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6,1	2	1	1	20
0	1	2	9,2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6,2	2	2	0	21
0	2	1	9,3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	3	0	9,4	2	3	0	29
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	1	13	2	3	2	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
0	0	0	3,6	3	0	0	23
1	0	1	7,2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7,3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3	29	3	3	3	>1100



## Lampiran M (normatif) Penentuan *salmonella*

### M.1 Prinsip

Pertumbuhan *Salmonella* pada pembenihan selektif yang dilanjutkan dengan uji biokimia dan serologi.

### M.2 Pembenihan

- 1) *Selenite Crstine Broth (SCB)*
- 2) *Tetrathionate Broth (TTB)*
- 3) *Rappaport Vassiliadis (RV) medium*
- 4) *Lactose Broth*
- 5) *Hectoen Enteric (HE) Agar*
- 6) *XLD Agar*
- 7) *Bismuth Sulphite Agar (BSA)*
- 8) *Triple Sugar Iron (TSI) Agar*
- 9) *Lysine Iron Agar (LIA)*
- 10) *Mac Concey' s Agar*
- 11) *Urea broth; atau rapid urea broth*
- 12) *Lysine Decarboxylase Broth (LDB)*
- 13) *Phenol red carbohydrate broth (dulcitol, lactose atau sucrose)*
- 14) *Purple carbohydrate broth (dulcitol, lactose atau sucrose)*
- 15) *Tryptone broth*
- 16) *KCN broth*
- 17) *Malonate broth*
- 18) *Kovacs reagent*
- 19) *Brain*
- 20) *Trypticase-soy tryptose atau formalinized physiological saline solution*
- 21) *Physiological saline solution*
- 22) *MR – VP*
- 23) *VP reagents*
- 24) *MR indicator*
- 25) *Simmo's citrate agar*
- 26) *PH test paper (pH range 6 – 8)*
- 27) *Salmonella polyvalent flagellar " H " antiserum*
- 28) *Salmonella polyvalent somatic " O " antiserum*

### M.3 Peralatan

- a) blender mekanis dengan dua atau kecepatan dengan "Rheostat control" supaya dapat memblender pada kecepatan permulaan 8.000 rpm sampai dengan 10.000 rpm;
- b) tabung blender steril dari gelas atau "stainless steel", bertutup, berkapasitas 1 liter dan tahan diotoklaf. Satu tabung untuk setiap contoh yang akan dianalisis;
- c) tabung steril, bermulut lebar, berkapasitas 0,5 liter, bertutup aliran, untuk tempat contoh setelah diblender;
- d) timbangan dengan anak timbangan, berkapasitas 1.000 g, dengan kepekaan 0,1 g;
- e) timbangan dengan anak timbangan, berkapasitas 120 g, dengan kepekaan 5 mg;
- f) inkubator (35 ± 1) °C;
- g) sendok-sendok steril;



- h) cawan petri, gelas atau plastik, 15 x 100 mm;
- i) pipet 1 ml dan berskala 0,01 ml, 10 ml dan berskala 0,1 ml;
- j) jarum inokulasi dengan diameter dalam sosok kira-kira 3 mm (ose);
- k) kantong plastik 28 x 37 cm, steril, yang dapat ditutup/disegel kembali.

#### M.4 Prosedur

##### M.4.1 Persiapan contoh

- a) secara aseptis timbang 25 g contoh ke dalam tabung blender steril;
- b) tambahkan 225 ml larutan lactose broth dan blender 2 menit;
- c) pindahkan ke dalam botol steril, biarkan selama 60 menit pada temperatur ruang;
- d) kocok dan ukur pH. Atur pH bila perlu sampai  $6,8 \pm 0,2$ , inkubasikan pada temperatur  $35^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.

##### M.4.2 Isolasi *Salmonella*

- a) Untuk produk makanan mentah, makanan yang kontaminasi tinggi, makanan ternak Kocok botol perlahan-lahan kemudian pipet 0,1 (jangan pakai mulut) dan pindahkan dalam 10 ml RV inkubasikan  $(42 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam. Dan 1 ml lagi pindahkan ke dalam 10 ml *tetrahionate broth*. Inkubasikan pada  $(43 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam.
- b) Untuk produk makanan lainnya Kocok perlahan-lahan kemudian pipet 1 ml (jangan pakai mulut) dan pindahkan ke dalam 10 ml SCB inkubasikan  $(42 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam. Dan 1 ml lagi pindahkan ke dalam 10 ml *tetrahionate broth*. Inkubasikan pada  $35^{\circ}\text{C}$  selama  $(24 \pm 2)$  jam.
- c) Inkubasi medium pra pengkayaan atau medium pengkayaan (SC dan TTB) Inkubasi medium pra pengkayaan atau medium pengkayaan (SC dan TTB) dapat dilakukan pada suhu refrigerator selama kurang lebih 72 jam.
- d) Dari *selenite cystine broth*/RV medium yang telah diinkubasikan diambil satu mata ose untuk masing-masing digoreskan pada cawan *Hectoen Enteric Agar*, *XLD Agar* dan *Bismuth Sulphite Agar*.
- e) Lakukan pula dengan *brilliant green tetrahionate broth* yang telah diinkubasikan. Inkubasikan cawan-cawan tersebut selama  $(24 \pm 2)$  jam pada  $35^{\circ}\text{C}$ .
- f) Perhatikan timbulnya koloni *Salmonella* pada media selektif.

##### Koloni yang khas (tipikal)

- Pada *Hectoen Enteric Agar*: koloni berwarna biru-hijau dengan satu tanpa inti hitam.
- Pada *XLD Agar*: koloni merah muda pucat, kedap cahaya atau bening, beberapa jenis menghasilkan koloni dengan inti hitam.
- Pada *Bismuth Sulphite Agar*: koloni berwarna coklat, hitam kadang-kadang dengan kilat logam. Medium sekelilingnya umumnya coklat, kemudian menjadi hitam dengan bertambahnya waktu inkubasi.

##### Koloni atipikal

- Pada *XLD* dan *HE Agar*: beberapa kultur *Salmonella* menghasilkan koloni yang berwarna kuning dengan atau tanpa inti hitam. Bila tidak ada koloni atipikal pada medium *HE* dan *XLD* setelah inkubasi 24 jam, ambil 2 atau lebih koloni yang atipikal untuk uji selanjutnya.
- Pada media *Bismuth Sulphite Agar* beberapa jenis menghasilkan koloni hijau dengan sedikit atau tanpa membuat medium sekelilingnya menjadi gelap.
- g) Pilih dua atau lebih koloni yang khas atau yang mencurigakan bila ada pada *HE Agar*, *XLD*, dan *Bismuth Sulphite Agar* (*BSA*) untuk ditanamkan pada *Triple Sugar Iron Agar* (*TSI*) dan *Lysine Iron Agar* (*LIA*). Bila pada cawan-cawan *BSA* tersebut tidak



mengandung koloni yang khas atau mencurigakan atau tidak mengandung koloni sama sekali, inkubasikan lagi selama  $(24 \pm 2)$  jam.

- h) Inokulasikan koloni pada tabung *TSI Agar* dan *LIA Agar* dengan menggores bagian miring dan menusuk bagian tegaknya (jangan mengambil lagi inokulum dari koloni dan jangan memanaskan jarum inokulasi sebelum selesai menginokulasi *LIA Agar*).
- i) Simpan cawan-cawan media selektif setelah diambil koloninya pada suhu  $5^{\circ}\text{C}$  sampai  $8^{\circ}\text{C}$ .
- j) Inkubasikan tabung *TSI Agar* dan *LIA Agar* selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  dengan tutup longgar. Biakan *Salmonella* positif pada *TSI Agar* menghasilkan bagian miring yang basa (merah) dan bagian tegak yang asam (kuning), dengan atau tanpa  $\text{H}_2\text{S}$  (penghitaman agar), sedangkan biakan *Salmonella* positif pada *LIA Agar* menghasilkan reaksi basa pada seluruh media. Bila terbentuk  $\text{H}_2\text{S}$  bagian tegak dari media berwarna hitam.
- k) Bila reaksi-reaksi yang khas tidak nampak, ambil lagi beberapa koloni dari cawan *Hectoen Enteric Agar*, *XLD Agar* dan *Bismuth Sulphite Agar* untuk dipindahkan pada *TSI* dan *LIA Agar*.
- l) Semua biakan pada *TSI* dan *LIA* yang diduga *Salmonella* positif, disimpan untuk dicari biokimianya. *TSI* yang tampak seperti non *Salmonella* tapi memberi reaksi khas *Salmonella* pada *LIA* dianggap sebagai *presumptive positif* dan selanjutnya diuji secara biokimia, dan juga bila reaksi *LIA* menghasilkan asam pada bagian tegak dan alkalin pada bagian miring dan asam pada tegak *TSI* harus dilanjutkan uji biokimia dan serologinya.
- m) Lakukan uji biokimia dan identifikasi serologis dan minimal enam biakan *TSI* yang *presumptive positif*. Bila perlu keenam biakan *TSI* yang *presumptive positif* ini dapat diambil dari satu set cawan agar selektif.

#### M.4.3 Identifikasi *salmonella*

##### M.4.3.1 Biakan campuran

- a) bila biakan pada agar miring *TSI* kelihatannya campuran, goreskan pada *Mac Conkey Agar*, *XLD Agar* atau *HE Agar* dan inkubasikan selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ ;
- b) pada *Mac Conkey Agar* koloni yang khas tampak bening dan tak berwarna, kadang-kadang dengan inti yang gelap;
- c) pada *XLD Agar* dan *HE Agar* koloni yang khas pada M.4.2.f) lanjutkan pengerjaan seperti M.4.2.g).

##### M.4.3.2 Biakan murni

###### Uji urease

Pindahkan 2 mata ose dari biakan *TSI Agar* yang *presumptive positif* ke dalam tabung dengan: *rapid urea broth*, inkubasikan selama 2 jam dalam penangas air pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Atau ke dalam tabung *urea broth* dan inkubasikan selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ . Buang semua biakan yang menunjukkan uji positif (berwarna ungu merah) dan pertahankan semua biakan negatif (tak ada perubahan pada warna oranye dari media) untuk diuji selanjutnya.

##### M.4.3.3 Uji serologi flagellar (H) untuk *salmonella*

- a) Pindahkan satu mata ose biakan *TSI* yang urease negatif ke *brain heart infusion broth*, inkubasikan selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$ . Sampai terlihat pertumbuhan (uji pada hari itu juga) atau pindahkan ke *trypticase-soy tryptose broth*, inkubasikan selama  $(24 \pm 2)$  jam pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  (uji pada esok harinya).
- b) Pada 5 ml dari masing-masing biakan dalam broth, tambahkan 2,5 ml larutan *formalinized physiological saline*.
- c) Pilih dua biakan yang telah diberi formalin lalu uji dengan *Salmonella flagellar* (H) antisera: dalam tabung serologis 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm, masukkan 0,5 ml



seperlunya. Tambahkan 0,5 ml antigen yang akan diuji. Buat sebagai kontrol campuran 0,5 *formalinized saline* dengan 0,5 ml antigen. Inkubasikan campuran-campuran tersebut 1 jam dalam penangas air pada 50 °C. Amati setiap 15 menit dan baca hasilnya setelah satu jam.

- positif: terjadi aglutinasi dalam tabung dan tak terjadi aglutinasi pada kontrol;
- negatif: tak terjadi aglutinasi dalam tabung kultur maupun kontrol;
- tidak spesifik: terjadi aglutinasi dalam tabung kultur maupun kontrol.

#### M.4.3.4 Uji biokimia

##### a) *Lysine Decarboxylase Broth (LDB)*

Inokulasi media *LDB* atau *PDDB* dengan satu mata ose dari biakan *TSI Agar*, tutup rapat dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C, periksa paling sedikit setiap 24 jam. *Salmonella* menunjukkan reaksi basa dengan warna ungu pada seluruh media (uji negatif, bila warna seluruh media adalah kuning) bila medium nampak seperti antara ungu atau kuning, tambahkan beberapa tetes larutan *BGP* 0,2 % dan baca hasilnya.

##### b) *Phenol Red Dulcitol Broth (PRDB) atau Purple Dulcitol Broth (PDB)*

Inokulasi media *PRDB* atau *PDB* dengan satu mata ose dari biakan *TSI Agar*. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C, periksa paling sedikit 24 jam. *Salmonella* memberi uji positif jika terjadi pembentukan gas dan reaksi asam (kuning), sedangkan uji negatif jika terjadi reaksi basa (merah) dan tanpa pembentukan gas.

##### c) *Tryptone Broth (TB)*

Inokulasikan media *TB* dengan satu mata ose dari biakan *TSI Agar*. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C dan uji sebagai berikut:

###### - ***KCN broth***

Pindahkan satu mata ose biakan dari dalam *tryptone broth* ke *KCN broth*.

Panaskan bibir tabung supaya dapat tertutup rapat bila disumbat dengan gabus berlilin dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C.

*Salmonella* tak dapat berkembang biak pada media ini. Uji dinyatakan negatif bila tak tampak kekeruhan.

###### - ***Malonate broth***

Pindahkan satu mata ose biakan dalam *tryptone broth* ke *malonate broth*. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C. Uji negatif jika tidak terjadi perubahan warna (tetap berwarna hijau), sedangkan uji positif jika terjadi warna biru. Spesies *Salmonella* kebanyakan menghasilkan uji yang negatif.

###### - ***Uji indol***

Pindahkan 5 ml biakan dalam *tryptone broth* ke tabung reaksi kosong.

Tambahkan 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml pereaksi *Kovacs*. Uji *indol* adalah negatif jika tidak terjadi warna merah. Buang kultur yang bukan *Salmonella* yang ditunjukkan dengan reaksi indol positif dan *serologi flagellar H* negatif atau positif dan *LDB* negatif.

#### M.4.3.5 *Salmonella Serological Somatic (O) test* (semua antisera *Salmonella* harus diuji dahulu dengan biakan yang telah dikenal).

- Pada bagian dalam cawan petri atau kaca obyek, gambar dengan pensil kaca 2 bidang berukuran masing-masing 1 cm x 2 cm buat emulsi 3 mm ose biakan dengan 2 ml NaCl 0,85%.
- Tambahkan 1 tetes *Salmonella Polyvalent Somatic (O)* antiserum pada satu bidang.
- Campur antiserum dan biakan dengan menggunakan jarum yang bersih dan steril.
- Goyang-goyangkan campuran tersebut selama 1 menit dan periksa pada dasar yang gelap di bawah sinar yang terang. Terjadinya aglutinasi menandakan reaksi yang positif.

Klasifikasi uji dengan *Polyvalent Flagellar (H) antiserum* sebagai:

- Positif: terjadi aglutinasi pada campuran, tak terjadi aglutinasi dalam kontrol dengan



- garam fisiologis.
- Negatif: tak terjadi aglutinasi pada campuran maupun pada kontrol dengan garam fisiologis.
  - Tidak spesifik: terjadi aglutinasi pada campuran maupun pada kontrol dengan garam fisiologis.
- e) Untuk klasifikasi *Salmonella* lihat Tabel M.4, No. 1 – 11. Jika pada biakan menunjukkan *Salmonella Polyvalen (H)* positif tetapi dalam reaksi biokimia tidak menunjukkan reaksi *Salmonella*, lakukan pemurnian seperti pada M.4.3.1 dan lakukan pengujian seperti di atas. Bila satu kultur TSI dari 25 g contoh dapat diklasifikasikan sebagai *Salmonella* pengujian kultur TSI lainnya dari 25 g contoh yang sama tidak diperlukan lagi.

#### M.4.3.6 Uji biokimia tambahan

Lakukan uji tambahan pada biakan yang tidak dapat diklasifikasikan sebagai *Salmonella* sp.

- a) **Phenol Red Lactose Broth (PRLB) atau Purple Lactose Broth (PLB)**  
Inokulasi dengan satu mata ose dari biakan pada TSI Agar yang belum diklasifikasi. Inkubasikan ( $48 \pm 2$ ) jam pada  $35^\circ\text{C}$ . Periksa paling kurang setiap 24 jam. Uji positif bila terjadi pembentukan gas dan atau reaksi asam (kuning). Uji negatif bila reaksi basa dan tak terbentuk gas. Dengan *Salmonella* biasanya dihasilkan uji yang negatif.
- b) **Phenol red Sucrose Broth atau Purple Sucrose Broth**  
Lakukan hal yang sama seperti M.4.3.4.
- c) **Medium MR – VP**  
Inokulasi dengan satu mata ose dari biakan pada TSI Agar yang belum diklasifikasi. Inkubasikan ( $48 \pm 2$ ) jam pada  $35^\circ\text{C}$ .

#### Lakukan uji VP

Pindahkan 1 ml biakan berumur 48 jam ke dalam tabung. Tambahkan 0,6 ml  $\alpha$ -naftol dan kocok. Tambahkan 0,2 ml larutan  $\text{KOH}_2$  40 % atau  $\text{NaOH}_2$  40 % dan kocok. Dapat ditambahkan beberapa kristal *creatine*. Baca hasilnya setelah 4 jam. Uji VP positif, bila terbentuk warna *eosin* merah muda. Dengan *Salmonella* dihasilkan uji yang negatif. Sisa medium MR – VP diinkubasikan kembali selama 48 jam pada  $35^\circ\text{C}$  untuk uji MR.

#### Lakukan uji MR

Pada medium MR – VP setelah inkubasi terakhir, tambahkan 5 tetes sampai dengan 6 tetes larutan *methyl red*, baca hasilnya dengan segera. Uji MR positif bila medium berubah menjadi merah. Sedangkan uji negatif bila medium berwarna kuning. *Salmonella* memberikan reaksi positif.

#### M.5 Klasifikasi dan laporan

- a) Klasifikasi sebagai *Salmonella* sp bila reaksi biokimia dan serologi seperti pada Tabel M.4. Dan klasifikasi sebagai non *Salmonella* sp bila reaksi biokimia dan serologi seperti pada Tabel M.5. Jika dari kedua kultur TSI tidak memberikan reaksi biokimia dari *Salmonella* seperti pada Tabel M.4, lakukan uji biokimia terhadap TSI yang urase negatif lainnya dari 25 g contoh yang sama.
- b) Laporkan *Salmonella* sp positif atau negatif dalam 25 g contoh.



Tabel M.4 - Reaksi biokimia *salmonella*

No	Pengujian atau Substrat	Positif	Negatif	Reaksi <i>Salmonella</i> sp <sup>a</sup>
1.	Glukosa (TSI)	Bagian tegak merah	Bagian tegak kuning	+
2.	<i>Lysine Decarboxylase</i>	Bagian tegak ungu	Bagian tegak kuning	+
3.	H <sub>2</sub> S (TSI dan LIA)	Hitam	Tidak ada warna hitam	+
4.	<i>Urease</i>	Merah ungu	Tidak berubah warna	-
5.	<i>Lysine Decarboxylase Broth</i>	Merah ungu	Warna kuning	+
6.	<i>Phenol Red Dulcitol Broth</i>	Kuning dengan / tanpa gas	Tidak ada perubahan warna dan tidak ada gas	+b
7.	KCN Broth	Ada pertumbuhan	Tidak ada pertumbuhan	-
8.	<i>Malone Broth</i>	Warna biru	Tidak ada perubahan warna	-c
9.	<i>Indol</i>	Warna violet	Warna kuning	-
10.	<i>Polyvalent Flagellar (H) Test</i>	Menggumpal	Tidak ada penggumpalan	+
11.	<i>Polyvalent Somatic (O) Test</i>	Menggumpal	Tidak ada penggumpalan	+
12.	<i>Phenol Red Lactose Broth</i>	Kuning dengan / tanpa gas	Tidak ada perubahan warna, tidak ada gas	-
13.	<i>Phenol Red Sucrose Broth</i>	Kuning dengan / tanpa gas	Tidak ada perubahan warna, tidak ada gas	-
14.	<i>Voges-Proskaver Test</i>	Merah muda – merah	Tidak ada perubahan warna	-
15.	<i>Methyl Red Test</i>	Merah	Warna kuning	+
16.	<i>Simon's Citrate</i>	Ada pertumbuhan / warna biru	Tidak ada pertumbuhan / tidak ada perubahan warna	V

**CATATAN**

a+ = 90 % atau lebih positif dalam 1 sampai 2 hari ;  
a- = 90 % atau lebih negatif dalam 1 sampai 2 hari ;  
b = mayoritas *Salmonella arizona* negatif ;  
c = mayoritas *Salmonella arizona* positif ;  
V = variabel.

Tabel M.5 - Kriteria untuk biakan non *salmonella*

No.	Reaksi / Substrat	Hasil
1.	<i>Urease</i>	Positif (ungu – merah )
2.	Reaksi Indol	Positif ungu (pada permukaan)
3.	<i>Polyvalent Flagellar (H)</i>	Negatif (tidak menggumpal)
4.	<i>Lysine Decarboxylase</i>	Negatif (kuning)
5.	KCN Broth	Positif ada pertumbuhan
6.	<i>Phenol Red Lactose Broth</i>	Positif kuning dengan atau tanpa gas
7.	<i>Phenol Red Sucrose Broth</i>	Positif kuning dengan atau tanpa gas
8.	KCN Broth	Positif (ada pertumbuhan)
	Reaksi VP	Positif (merah muda – merah)
	Reaksi MR	Negatif (kuning)



**Lampiran N**  
(normatif)  
**Penentuan filth**

**N.1 Prinsip**

Contoh direndam dalam kloroform, endapan dicuci, dipijarkan dan ditimbang sebagai *heavy filth*. Contoh dicuci dengan air destilasi diekstrak dengan petroleum eter dalam trap, diperiksa dibawah mikroskop.

**N.2 Peralatan**

- a) erlenmeyer trap (wildman) kapasitas 1.000 ml;
- b) gelas piala kapasitas 600 ml;
- c) corong buchner diameter 15 cm dan 7 cm;
- d) oven suhu 80 °C dan oven suhu 103 °C;
- e) kertas saring tak berabu;
- f) cawan petri diameter 80 mm;
- g) cawan;
- h) mikroskop.

**N.3 Bahan kimia**

- a) Kloroform;
- b) petroleum eter 40 °C sampai dengan 60 °C;
- c) petroleum eter 100 °C sampai dengan 120 °C.

**N.4 Prosedur****N.4.1 Persiapan contoh**

Hancurkan contoh dan timbang ( $25 \pm 0,1$ ) g ke dalam gelas piala. Tambahkan 200 ml petroleum eter dan didihkan pada penangas air hangat selama 15 menit. Tuang lapisan petroleum eter dengan hati-hati, jangan sampai bahan yang diuji terbawa.

**N.4.2 Heavy filth, pasir dan tanah**

Tambahkan 400 ml kloroform ke dalam bahan yang diuji. Biarkan selama 1 jam, sekali-kali diaduk. Pindahkan bahan dan pelarut ke dalam corong Buchner. Biarkan pasir dan tanah dalam gelas piala, jika cukup banyak sisa contoh yang tersisa dalam piala, tambahkan secukupnya campuran kloroform dan karbon tetraklorida untuk meningkatkan densitas pelarut sampai sisa contoh terapung. Pindahkan endapan ke dalam kertas saring tak berabu, cuci dengan air, periksa residu jika terdapat residu yang cukup banyak, tempatkan kertas saring ke dalam cawan yang diketahui bobotnya. Pijarkan dan timbang residu. Keringkan residu dalam corong Buchner selama 1 jam pada oven 80 °C.

**N.4.3 Pemisahan light filth**

Pindahkan residu ke dalam trap, tambahkan kira-kira 150 ml H<sub>2</sub>O, panaskan sampai mendidih dan didihkan selama 15 menit sambil diaduk. Cuci bagian dalam trap, dinginkan sampai suhu dibawah 20 °C. Encerkan sampai kira-kira 600 ml dengan air destilasi. Tambahkan melalui batang pengaduk 25 ml petroleum eter 100 °C sampai dengan 120 °C, miringkan trap kira-kira 45 °C dan kocok dengan kecepatan empat gerakan per detik dengan



gerakan berputar yang cepat. Hindari percikan sepanjang permukaan dari cairan dalam trap. Biarkan selama lima menit, kemudian isi trap dengan H<sub>2</sub>O biarkan 30 menit, aduk setiap 5 menit. Putar tutup (stopper) untuk mengeluarkan kotoran dan naikkan sampai leher trap, yakinkan bahwa lapisan petroleum eter paling sedikit 1 cm dari cairan di antara lapisan di atas tutup atau stopper. Biarkan dan tahan pada posisi tersebut, pindahkan cairan dalam trap ke dalam corong Buchner dan saring. Tambahkan petroleum eter 100 °C sampai dengan 120 °C ke dalam isi trap dan aduk. Setelah 15 menit, ulangi pekerjaan di atas. Jika pada ekstraksi yang kedua menghasilkan jumlah kotoran yang cukup, tuangkan sebagian besar dari cairan dalam trap dan tambahkan lagi 15 ml petroleum eter ke dalam trap, lakukan ekstraksi yang ketiga. Pindahkan kertas saring dari corong Buchner dan tempatkan pada cawan petri. Panaskan pada oven 103 °C selama 30 menit. Periksa seluruh area dari kertas saring dengan mikroskop.

#### N.4.4 Cara menyatakan hasil

Nyatakan heavy filth dengan rumus:

$$\frac{m_1}{m_0} \times 100 \%$$

dengan pengertian:

$m_1$  adalah bobot residu yang didapat;

$m_0$  adalah bobot contoh yang diuji.

#### N.4.5 Light filth

Nyatakan ada tidaknya binatang, jika perlu catat jumlah bagian dari insek bulu binatang, pengerat atau bagian lainnya dalam contoh yang diuji.



**Lampiran O**  
(normatif)  
**Penentuan residu pestisida**

Penentuan residu pestisida sesuai metode pengujian pestisida dalam hasil pertanian yang diterbitkan tahun 1997 oleh Komisi Pestisida (Kompes) Departemen Pertanian.





## Bibliografi

FAO, *Model ordinance*, 1972.

ISO 1114:1977, *Cocoa beans – Cut test*

ISO 2451:1973, *Cocoa beans – Specification*.

ISO 2291:1980 (E), *Cocoa beans - Determination of moisture content (routine method)*.

ISO 2292:1973 (E), *Cocoa beans – Sampling*.















**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.or.id](mailto:bsn@bsn.or.id)